



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, 15/55, 5/10, C07K 16/18, G01N 33/50, A61K 35/12, 39/395	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/34100 (43) Date de publication internationale: 31 octobre 1996 (31.10.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00634 (22) Date de dépôt international: 25 avril 1996 (25.04.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/04922 25 avril 1995 (25.04.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE(CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): STROSBERG, Arthur, Donny [BE/FR]; 66, rue de Javel, F-75015 Paris (FR). ZILBERFARB, Vladimir [FR/FR]; 14, rue Le Perdriel, F- 91140 Villebon-sur-Yvette (FR). (74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reques.</i>
(54) Title: IMMORTALISED CELL LINES FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE, PROCESS FOR PREPARING SAME AND APPLICATIONS THEREOF		
(54) Titre: LIGNEES IMMORTALISEES DE CELLULES ISSUES DU TISSU ADIPEUX HUMAIN, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS		
(57) Abstract		
<p>Immortalised cell lines from human adipose tissue, process for preparing same and applications thereof as a study model for the physiopathology of the metabolism and particularly for obesity and diabetes, as tools for developing drugs for the treatment of disease states linked to metabolic disorders such as obesity and diabetes, and as drugs. The cell lines are formed of pre-adipocytes containing a nucleic acid fragment including at least one fragment immortalising a viral oncogene, and at least one promoter selected from the group containing a promoter of said viral oncogene and a human vimentine gene regulatory region fragment. They express at least one of the following proteins: the $\beta 1$ and $\beta 2$-adrenergic receptors, the uncoupling protein (UCP), the glucose transporters, Glut1 and Glut 4 and lipoprotein lipase (LPL). They are capable of being converted into mature adipocytes which produce fat and further express the $\alpha 2_A$ and $\beta 3$-adrenergic receptors as well as the expression product of the Ob gene, and have an inverted Glut4/Glut1 ratio in relation to said immortalised pre-adipocytes.</p>		
(57) Abrégé		
<p>Lignées immortalisées de cellules issues du tissu adipeux humain, leur procédé de préparation et leurs applications en tant que modèle d'étude de la physiopathologie du métabolisme et notamment de l'obésité et du diabète, comme outils pour le développement de médicaments pour le traitement des états pathologiques liés aux troubles du métabolisme tels que l'obésité et le diabète et comme médicaments. Lesdites lignées sont constituées par des préadipocytes contenant un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral et au moins un promoteur sélectionné dans le groupe qui comprend le promoteur dudit oncogène viral et un fragment des régions régulatrices du gène humain de la vimentine; expriment au moins l'une des protéines suivantes: récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$-adrénergiques, protéine découplante (UCP), transporteurs de glucose, Glut1 et Glut4, lipoprotéine lipase (LPL) et sont aptes à être converties en adipocytes matures, qui produisent de la graisse et expriment en outre les récepteurs $\alpha 2_A$ et $\beta 3$ adrénergiques ainsi que le produit d'expression du gène Ob et présentent un rapport Glut4/Glut1 inversé, par rapport auxdits préadipocytes immortalisés.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

LIGNEES IMMORTALISEES DE CELLULES ISSUES DU TISSU ADIPEUX HUMAIN, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS.

La présente invention est relative à des
5 lignées immortalisées de cellules issues du tissu adipeux humain, à leur procédé de préparation et à leurs applications en tant que modèle d'étude de la physiopathologie du métabolisme et notamment de l'obésité et du diabète, comme outils pour le développement de médicaments pour le
10 traitement des états pathologiques liés aux troubles du métabolisme tels que l'obésité et le diabète et comme médicaments.

L'obésité et le diabète constituent des problèmes de santé majeurs dans le monde occidental et des
15 facteurs de risque importants de mortalité précoce. Les facteurs considérés comme responsables du développement de l'obésité et du diabète ne sont pas encore tous bien connus. Toutefois, il est maintenant bien admis que les défauts de thermogenèse (par exemple des défauts de dissipation d'énergie sous forme de chaleur, avec comme conséquence une accumulation de lipides) interviennent dans
20 les mécanismes de l'obésité ; il est également bien admis que le tissu adipeux et notamment le tissu adipeux brun est l'effecteur principal de la thermogenèse facultative chimique.
25

Le tissu adipeux (brun et blanc) est essentiellement constitué d'adipocytes (3/4 du nombre total de cellules du tissu adipeux). Les autres cellules présentes dans le tissu adipeux appartiennent notamment aux cellules
30 les précurseurs, également dénommées cellules interstitielles (cellules sans lipides) et comprennent en particulier les adipoblastes (cellules mésenchymateuses sans lipides) et les préadipocytes (cellules estérase-positives sans lipides).

35 Le tissu adipeux blanc (ou WAT pour white adipose tissue) est considéré comme un organe distinct du tissu adipeux brun (ou BAT pour brown adipose tissue) ; ces deux tissus adipeux se distinguent, notamment en ce

que leurs cellules précurseurs sont différentes ; la présence de protéines mitochondriales découplantes (ou UCP pour uncoupling protein) est spécifique au BAT (tissu adipeux brun). Pour ce qui concerne plus particulièrement
5 le tissu adipeux brun, la chronologie de la différenciation cellulaire apparaît être la suivante : cellules interstitielles, adipocytes bruns peu différenciés, adipocytes bruns matures. Les adipocytes bruns sont caractérisés par la présence de gouttelettes de triglycérides et
10 de nombreuses mitochondries ainsi que par la présence d'une protéine particulière, la protéine découplante, précitée.

La stimulation de la prolifération et de la différenciation du tissu adipeux brun dépend notamment
15 des récepteurs β -adrénergiques. Le récepteur β 3-adrénergique humain a été caractérisé dans les dépôts adipeux blancs de l'adulte et dans le tissu adipeux brun des nouveau-nés et des malades atteints de phéochromocytome.

Le BAT est un tissu spécialisé dans la dissipation d'énergie, sous forme de chaleur. On le trouve
20 chez la plupart des mammifères nouveau-nés.

Il est le site majeur du stockage et de la mobilisation de l'énergie ; son rôle en tant qu'organe endocrine, autocrine et intracrine a également été éta-
25 bli.

Aussi bien des lignées cellulaires réalisées chez la souris [lignée murine 3T3, lignée F44-2A (Green et al., Cell, 1975, 5, 19-27 et Cell, 1976, 7, 105-113), que des cellules vasculaires stromales du tissu adipeux
30 ont également fait l'objet d'études, dans la mesure où les préadipocytes sont présents dans le compartiment vasculaire-stromal (G. Ailhaud et al., Int. J. Obesity, 1992, 16, (suppl. 2), S17-S21).

Toutefois, ces différentes lignées ou cellules
35 ne sont pas adaptées à l'étude de la physiopathologie du métabolisme humain. En conséquence, il existe un besoin

pour le contrôle des maladies du métabolisme et notamment de l'obésité et du diabète chez l'homme, tant du point de vue pharmacologique (modèle d'étude pharmacologique des agents lipolytiques) que du point de vue thérapeutique.

5 Or, jusqu'à présent, il a été impossible d'obtenir des lignées de préadipocytes humains, aptes à être maintenus en culture suffisamment longtemps, pour pouvoir d'une part, effectivement servir de modèle à l'étude d'agents lipolytiques et d'autre part être égale-
10 ment aptes à être utilisés en tant qu'agent thérapeutique (en thérapie génique, par exemple). En effet, les expériences réalisées sur des adipocytes humains en culture primaire sont difficilement reproductibles et difficilement réalisables de manière systématique.

15 La Demanderesse s'est, en conséquence, donné pour but de pourvoir à des lignées de cellules, issues du tissu adipeux brun ou blanc, utiles à la fois en tant que modèle d'étude des agents lipolytiques et comme agent thérapeutique (surexpression de la protéine découplante,
20 par exemple) et qui ne présentent pas les inconvénients des adipocytes en culture primaire.

La présente invention a pour objet des lignées cellulaires, issues du tissu adipeux, caractérisées :

- en ce qu'elles sont constituées par des pré-
25 adipocytes contenant un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral et au moins un promoteur sélectionné dans le groupe qui comprend le promoteur dudit oncogène viral et un fragment des régions régulatrices du gène humain de la
30 vimentine,

- en ce qu'elles expriment au moins l'une des protéines suivantes : récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, protéine découplante (UCP), transporteurs du glucose, Glut1 et Glut4, lipoprotéine lipase (LPL) et

35 - en ce qu'elles sont aptes à être converties en adipocytes matures, qui produisent des lipides

(graisse), expriment en outre les récepteurs α_2 , et β_3 adrénergiques ainsi que le produit d'expression du gène Ob et présentent un rapport Glut4/Glut1 inversé, par rapport aux dits préadipocytes immortalisés.

5 Les marqueurs spécifiques des adipocytes matures (tissu adipeux brun et tissu adipeux blanc) sont notamment : Glut4, adipsine, LPL, enzyme de la lipolyse (hormone sensitive lipase : HSL), récepteurs β_1 -, β_2 - et β_3 -adrénergiques et produit de l'expression du gène Ob.

10 Selon un mode de réalisation avantageux, lesdites lignées sont issues du tissu adipeux brun.

Conformément à ce mode de réalisation avantageux desdites lignées, le fragment immortalisant est constitué par un fragment de l'oncogène T SV40, codant
15 pour l'antigène T du virus SV40.

Également conformément à ce mode de réalisation desdites lignées, le promoteur est sélectionné parmi le promoteur de l'oncogène T SV40 et le promoteur de la vimentine et plus particulièrement le fragment d'acide
20 nucléique du promoteur de la vimentine compris entre les bases -878 et +93 de la séquence régulatrice de la vimentine.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, le fragment d'acide nucléique du promoteur de la vimentine comprend les bases -830 à -539 et/ou
25 le fragment -540 à -140, situés en amont du site CAP.

De telles lignées, dénommées PAZ 6, ont été déposées auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) tenue par l'INSTITUT PASTEUR, en
30 date du 7 février 1995 sous le n° I-1531.

De telles lignées de préadipocytes humains immortalisés présentent au moins les propriétés suivantes :

- elles expriment au moins les protéines suivantes : récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques, protéine découplante, Glut1 et Glut4, lipoprotéine lipase ;
35

- elles sont aptes à être converties en adipocytes matures :

- . qui produisent de la graisse multilobaire,
- . qui contiennent de nombreuses mitochondries,

5 . qui expriment les récepteurs α_2 et β_3 adrénergiques ainsi que le produit d'expression du gène Ob, et

. qui présentent un rapport Glut4/Glut1 inversé, par rapport auxdits préadipocytes immortalisés.

10 Un fragment d'acide nucléique hybride (oncogène T de SV 40 associé au promoteur de la vimentine) a été décrit (Demande de Brevet européen 90402009.6). L'introduction de ce fragment linéaire recombinant dans le noyau de cellules en cultures primaires
15 res telles que cellules musculaires, cellules épithéliales et cellules endothéliales est suivi d'une intégration et de l'expression de l'antigène grand T, induisant une prolifération cellulaire, conduisant à des lignées cellulaires permanentes.

20 Toutefois, les travaux de l'Art antérieur ne suggèrent pas la possibilité que des cellules de préadipocytes, issues du tissu adipeux (brun ou blanc) humain puissent effectivement être immortalisées, en gardant toutes leurs caractéristiques (marqueurs et possibilité
25 de différenciation). En effet, aucune lignée humaine de ce type n'a jamais pu être obtenue, qu'elle soit d'origine pathologique (par exemple cancéreuse) ou expérimentale. Bien au contraire, de nombreuses tentatives (H. HAUNER et al., J. Clin. Invest., 1989, 84, 1663-1670)
30 d'immortalisation ont toutes échouées, ce qui distinguait, jusqu'à présent, les adipocytes humains de nombreux autres types cellulaires.

Or, de manière inattendue, les lignées de préadipocytes immortalisés, conformes à l'invention, présentent
35 effectivement les fonctionnalités des préadipocytes humains : expression des marqueurs des préadipocytes et

maturation en adipocytes dans des conditions appropriées, notamment en présence d'insuline, de glucocorticoïdes et éventuellement d'IGF-I.

En particulier, les préadipocytes immortalisés conformes à l'invention, permettent :

- l'étude des différentes étapes de maturation de la différenciation en adipocytes : apparition des marqueurs spécifiques des adipocytes tels que récepteurs α_2 , et β_3 adrénergiques et présence de gouttelettes lipidiques,

- l'analyse de l'influence de différentes conditions de culture sur la différenciation des adipocytes : insuline, glucocorticoïdes, triiodothyronine, éventuellement associée à la pioglitazone et ses dérivés, agonistes β -adrénergiques, NPY, mélatonine...,

- l'analyse du rôle du produit d'expression du gène Ob dans les adipocytes différenciés et matures selon l'invention dans la thermogénèse,

- une étude plus proche de la réalité que ne sont les cellules CHO-RA β_3 , pour l'étude des récepteurs intervenant dans les processus de lipolyse, tels que les récepteurs β_2 et β_3 adrénergiques.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de préadipocytes immortalisés, issus de tissus adipeux (bruns ou blancs) humains, caractérisé en ce qu'il comprend la transformation de préadipocytes issus du tissu adipeux (brun ou blanc) humain par une séquence d'acide nucléique telle que définie ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un procédé de conversion des préadipocytes conformes à l'invention en adipocytes matures, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture des préadipocytes immortalisés conformes à l'invention, dans un milieu contenant au moins de l'insuline.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, ledit milieu comprend en outre au moins l'un des composés suivants : glucocorticoïde, triiodothyronine (T3), éventuellement associée à de la pioglitazone ou à ses dérivés, agonistes des récepteurs β -adrénergiques, NPY, mélatonine.

De manière avantageuse, les préadipocytes immortalisés conformes à l'invention constituent également un outil pour la sélection de substances intervenant dans l'activation de la lipolyse et/ou de la thermogénèse ; conformément à l'invention, le procédé de sélection et d'identification de substances capables de réguler la lipolyse et/ou la thermogénèse comprend :

- la mise en contact des préadipocytes immortalisés conformes à l'invention avec au moins une substance apte à les transformer en adipocytes,

- la mise en contact des adipocytes matures obtenus avec une substance agissant sur au moins un récepteur tel que les récepteurs α_2 , ou β_3 adrénergiques, les récepteurs de l'insuline et de l'IGF, les récepteurs de l'ACTH et les récepteurs du métabolisme du glucose (Glut1, Glut4) desdits adipocytes matures, en vue de la modulation de la lipolyse et/ou de la thermogénèse et

- la détection de la formation d'un complexe du type ligand-récepteur.

Un tel procédé permet donc la sélection de ligands spécifiques des différents récepteurs cités : α_2 , ou β_3 adrénergiques, récepteurs de l'insuline et de l'IGF, récepteurs de l'ACTH et récepteurs du métabolisme du glucose (Glut1, Glut4) des adipocytes matures, lesquels ligands agissent en outre sur la modulation de la lipolyse et/ou de la thermogénèse.

La présente invention a également pour objet un modèle d'étude des protéines exprimées par les adipocytes, notamment les récepteurs α_2 , ou β_3 adrénergiques,

les récepteurs de l'insuline, de l'IGF, de l'ACTH et les récepteurs du métabolisme du glucose (Glut1, Glut4) humains, caractérisé en ce qu'il est constitué par des adipocytes matures obtenus à partir des préadipocytes
5 immortalisés conformes à l'invention.

Un tel modèle permet l'étude, d'un point de vue pharmacologique, des récepteurs impliqués dans les processus de lipolyse et de thermogenèse, qui lorsqu'ils présentent des anomalies, induisent des états pathologi-
10 ques tels que le diabète et/ou l'obésité. Un tel modèle, particulièrement proche de l'état physiologique humain permet l'identification de ligands, plus affins pour ces récepteurs et ainsi la mise au point de médicaments actifs dans les maladies précitées.

15 La présente invention a également pour objet un modèle d'étude de la régulation des gènes présents dans les adipocytes humains, caractérisé en ce qu'il est constitué par des préadipocytes immortalisés conformes à l'invention ou des adipocytes matures obtenus à partir
20 desdits préadipocytes immortalisés.

La présente invention a, en outre, pour objet un procédé pour l'étude de l'affinité d'un récepteur exprimé par des adipocytes, pour un ou plusieurs ligands déterminés, lequel procédé comprend :

- 25 - la mise en contact des préadipocytes immortalisés conformes à l'invention, avec au moins une substance apte à les transformer en adipocytes,
- la mise en contact des adipocytes matures obtenus avec les ligands déterminés, et
30 - la détection d'une réaction affine entre lesdits adipocytes et lesdits ligands déterminés.

La présente invention a, également, pour objet des compositions lipolytiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent des adipocytes matures obtenus à
35 partir des préadipocytes immortalisés conformes à l'invention.

La présente invention a, en outre, pour objet des compositions pharmaceutiques destinées à combattre l'obésité, caractérisées en ce qu'elles comprennent des adipocytes bruns matures, obtenus à partir des préadipocytes immortalisés conformes à l'invention, éventuellement associées à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet des anticorps anti-adipocytes, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par immunisation d'un animal approprié avec des adipocytes matures obtenus conformément au procédé de conversion des préadipocytes immortalisés en adipocytes matures selon l'invention.

De tels anticorps sont particulièrement adaptés à leur utilisation pour l'immunothérapie de l'obésité, notamment en supprimant les adipocytes en excès.

La présente invention a également pour objet des séquences d'acide nucléique, issues des lignées conformes à l'invention, caractérisées en ce qu'elles sont aptes à exprimer au moins l'une des protéines suivantes : récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, protéine découplante, Glut1 et Glut4, lipoprotéine lipase (LPL).

La présente invention a, en outre, pour objet un kit ou trousse de détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour une protéine exprimée par un adipocyte, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une culture de préadipocytes conformes à l'invention,
- des moyens de conversion desdits préadipocytes en adipocytes matures, et
- un ou plusieurs ligands témoins.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet

de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre les produits exprimés par les préadipocytes immortalisés conformes à l'invention,
- la figure 2 montre la différenciation des préadipocytes en culture,
- la figure 3 montre les produits exprimés par les adipocytes obtenus à partir des préadipocytes conformes à l'invention,
- la figure 4 illustre l'effet d'un certain nombre d'agonistes β sur la lipolyse.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Lignée de préadipocytes bruns humains conforme à l'invention.

1) Isolement de préadipocytes d'origine humaine :

Du tissu adipeux brun est prélevé sur un enfant âgé de 18 mois, atteint d'un néphroblastome.

Les cellules vasculaires stromales sont obtenues à partir de ce tissu par une digestion à la collagénase, conformément à la méthode décrite par HAUNER et al. (J. Clin. Invest., 1989, 84, 1663-1670).

Le traitement du tissu adipeux brun est réalisé comme suit :

2 mg/ml de collagénase A (Boehringer) dans un tampon KRBH (Krebs Ringer Bicarbonate) comprenant en outre 20 mg de sérum albumine bovine (BSA)/ml sont mis en contact avec ledit tissu ; la digestion est réalisée pendant 40 min à 37°C sous agitation (bain-marie 100 t/min).

Une première filtration sur nylon (diamètre des pores : 190 μ m) est réalisée, puis les fragments restants sont à nouveau digérés pendant 30 min avec la même

solution à base de collagénase et filtrés également sur une membrane de nylon dont le diamètre de pores est de 190 μm .

Les suspensions cellulaires obtenues sont centrifugées à 200 g pendant 10 min.

Le culot cellulaire est lavé avec un tampon Krebs Ringer contenant de la sérumalbumine bovine (BSA), puis avec le milieu de culture ; le culot contient les préadipocytes.

Les cellules sont traitées avec une solution de Gey's, afin d'éliminer les hématies.

Les cellules obtenues (préadipocytes) sont ensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre contenant 2 ml d'un milieu de culture comprenant : DMEM/HAM F12 (1:1 vol/vol) contenant : pénicilline 100 U/ml, streptomycine 0,1 mg/ml, sérum de veau à 7,5 %, sérum de veau de nouveau-né à 2,5 % (Boehringer).

La densité d'ensemencement est de 20 000 cellules/cm².

Les cultures sont maintenues à 37°C pendant 16 heures, dans une atmosphère contenant 10 % de CO₂ et 90 % d'air.

Après adhésion, les cellules sont lavées dans un tampon PBS et le milieu de culture est renouvelé et est constitué de 2 ml d'un milieu ITT (DMEM/Ham's F12 (1:1, v/v) et glutamax I, contenant 33 μM de biotine, 17 μM de pantothénate, 15 mM d'hépès, 0,2 nM de triiodothyronine (T3), de la pénicilline à 100 U/ml, de la streptomycine à 0,1 mg/ml), du sérum de veau à 7,5 % et du sérum de veau nouveau né à 2,5 %.

Le milieu est changé tous les 2 jours.

2) Immortalisation :

Les cellules ainsi obtenues sont transfectées par microinjection avec une construction comprenant la séquence codant pour l'antigène grand T de SV40 sous le contrôle du promoteur de la vimentine (Hu Vim 830-T/t).

Le plasmide contenant cette séquence est décrit dans la Demande de Brevet européen n° 90402009.6 ; il exprime l'antigène T et l'antigène t du virus SV40 et est obtenu comme suit :

5 Le fragment -830-+93 du promoteur de la vimentine est cloné dans un plasmide pUC18 ; les clones sont obtenus par digestion de la séquence 5' du gène de la vimentine au niveau du site de l'enzyme de restriction PvuII.

10 Le plasmide pUC18 contenant le fragment d'ADN du promoteur de la vimentine est linéarisé par l'enzyme de restriction XbaI ; on obtient une extrémité 3' cohésive, qui est ajustée de manière à obtenir une extrémité franche, puis on lie le fragment d'ADN du promoteur de la
15 vimentine ainsi obtenu avec le fragment d'ADN de l'antigène T, par ligation de l'extrémité 3' XbaI du promoteur avec l'extrémité SfiI du fragment SV40.

Les extrémités BamHI 5' et 3' sont liées en présence de T4 ligase.

20 Les séquences codant pour l'antigène T sont ainsi sous le contrôle de la région régulatrice de la vimentine de 830 paires de bases.

Les cellules ainsi transfectées sont cultivées sur le même milieu, sans T3 ; lorsqu'elles atteignent la
25 confluence, elles sont trypsinisées une fois par semaine, de manière à permettre un passage hebdomadaire.

On obtient ainsi la lignée cellulaire de préadipocytes immortalisés, dénommée PAZ-6.

3) Caractéristiques de la lignée cellulaire de
30 préadipocytes immortalisés PAZ-6 :

Les préadipocytes bruns immortalisés, dénommés PAZ-6, peuvent être mis en culture (passage hebdomadaire) pendant plusieurs mois sans perdre leurs caractéristiques morphologiques ou leurs marqueurs moléculaires qui
35 peuvent être identifiés par PCR.

- différenciation en adipocytes matures :

A n'importe quel moment, les préadipocytes bruns immortalisés obtenus peuvent être convertis en adipocytes par traitement avec de l'insuline et de la dexaméthasone ; cette conversion est caractérisée par l'accumulation de graisses multilobaires et par l'expression des marqueurs spécifiques des adipocytes que sont les récepteurs α_2 et β_3 adrénergiques, ainsi que l'expression de la lipoprotéine lipase.

Les conditions de la conversion sont les suivantes :

les cellules sontensemencées à une densité de 10 000 cellules/cm² et cultivées pendant 3 jours dans un milieu contenant du 6 % de sérum de veau foetal, de manière à obtenir la confluence ; on additionne ensuite aux dites cellules un milieu ITT (milieu DMEM/HAM F12 supplémenté avec de la biotine, du pantothénate, de l'Hépès, de la T3, de la pénicilline et de la streptomycine, tel que défini ci-dessus), lequel milieu contient, en outre, 0,1 μ M de dexaméthasone, 850 nM d'insuline, 1 μ M de pioglitazone, 0,25 mM d'IBMX (3-isobutyl-1-méthyl-xanthine) pendant 4 jours. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours ; la différenciation est obtenue en environ deux semaines comme suit : après 15 à 21 jours dans ces conditions de culture, les cellules sont lavées avec un tampon PBS et remises en culture dans un milieu ne contenant ni insuline, ni dexaméthasone, ni sérum, mais supplémenté avec de la transferrine à 10 μ g/ml et de la T3 à 1 nM pendant 24 heures avant d'utiliser ces cellules différenciées.

La vitesse de conversion est accélérée en présence de pioglitazone : en effet, les préadipocytes PAZ-6, en présence d'insuline et de dexaméthasone sont différenciées en adipocytes matures capables d'accumuler des globules de graisse et d'effectuer une lipolyse ;

toutefois, cette différenciation est significativement augmentée en présence de pioglitazone.

a. Marqueurs des préadipocytes bruns immortalisés et des adipocytes matures obtenus à partir de ces préadipocytes :

récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, protéine découplante (UCP), GLUT1 et GLUT4 (voir figure 1) ; marqueurs spécifiques des adipocytes matures obtenus : récepteurs $\alpha 2$, et $\beta 3$ adrénergiques et lipoprotéine lipase (figure 3) ; en outre, la présence de nombreuses mitochondries confirme que ces cellules sont des adipocytes bruns matures.

- Matériel et méthode mis en oeuvre :

Après différenciation, les adipocytes matures sont cultivés 24 à 48 heures dans le milieu ITT supplémenté avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de transferrine.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

L'ARN total des cellules PAZ-6 à analyser (préadipocytes immortalisés ou adipocytes matures) est extrait (CATHALA, 1983, DNA, 2, 329-335) et traité pendant 20 min à 37°C avec 0,3 U de DNase I sans RNase (RQ1 DNase, Promega) par μg d'acide nucléique, dans un milieu comprenant 40 mM de tampon Tris-HCl à pH 7,9, 10 mM de NaCl et 6 mM de MgCl₂, en présence de 2 U/ μl d'inhibiteur de RNase placentaire (RNasin, Promega). L'ARN est ensuite extrait par un mélange phénol/chloroforme et précipité.

La synthèse de l'ADNc est effectuée avec 100 U de transcriptase inverse de MLV (Gibco BRL) avec 200 ng d'ARN DNasé dans 10 μl de tampon de transcriptase inverse (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, et 10 mM DTT) contenant 0,4 mM de chaque dNTP, 10 μM d'hexanucléotides aléatoires (Pharmacia, France) et 2 U/ μl d'inhibiteur de RNase placentaire. Pour les gènes sans introns, un contrôle sans transcriptase inverse a

été effectué pour vérifier que l'amplification ne résulte pas d'ADN génomique résiduel.

Les échantillons sont ensuite supplémentés avec 4 µl de tampon 10xPCR (tampon 1xPCR : 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,0 à 25°C, 0,1 % Triton X-100 et 1,5 mM MgCl₂), 0,5 µl de chaque dNTP 25 mM, 10 µl de DMSO à 50 % (pour les récepteurs β₁, β₂, β₃, α₂ et l'adipsine), 0,5 µl d'oligonucléotides sens et antisens à 25 mM chacun, 1 U de Taq-ADN polymérase (Promega) et de l'eau jusqu'à 40 µl.

Les ADNc sont dénaturés pendant 2 minutes à 94°C et amplifiés avec 29 cycles de températures (94°C, 15 s ; 60°C, 30 s ; 72°C, 30 s) suivis par 3 minutes d'extension finale à 72°C dans un thermocycleur (GeneAmpPCR System 9600, Perkin-Elmer Cetus).

Les séquences des oligonucléotides sens et antisens et la taille des produits d'amplification sont les suivantes :

- RA-β₁ :
séquences oligonucléotidiques :
5'-TCGTGTGCACCGTGTGGGCC-3' (SEQ ID NO: 1 et
5'-AGGAAACGGCGCTCGCAGCTGTCTG-3' (SEQ ID NO: 2) ;
taille du produit amplifié : 265 pb ;
- RA-β₂ :
séquences oligonucléotidiques :
5'-GCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC-3' (SEQ ID NO: 3) et
5'-CCCATCCTGCTCCACCT-3' (SEQ ID NO: 4) ;
taille du produit amplifié : 329 pb ;
- RA-β₃ :
séquences oligonucléotidiques :
5'-ATGGCTCCGTGGCCTCAC-3' (SEQ ID NO: 5) et
5'-CCCAACGGCCAGTGGCCAGTCAGCG-3' (SEQ ID NO: 6) ;
taille du produit amplifié : 316 pb (KRIEF, J.
Clin. Invest., 1993, 91, 344-349).

- UCP :
séquences oligonucléotidiques :
5'-TAGGTATAAAGGTGTCCTGG-3' (SEQ ID NO: 7) et
5'-CACTTTTGTACTGTCCTGGTGG-3' (SEQ ID NO:8) ;
- 5 taille du produit amplifié : 590 pb (CASSARD
et al., J. Cell Biochem., 1990, 43, 255-264).
Selon le type d'amplification on obtient deux
produits :
U = 29 cycles PCR
10 U' = 39 cycles PCR.
- β -actine :
séquences oligonucléotidiques :
5'-GAGACCTTCAACACCCC-3' (SEQ ID NO: 9) et
5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAG-3' (SEQ ID NO:10) ;
- 15 taille du produit amplifié : 236 pb (FEVE et
al., J. Biol. Chem., 1992, 267, 15909-15915) ;
- α 2-A :
séquences oligonucléotidiques :
5'-CGAGCGAGCCAGGTGAAGCC-3' (SEQ ID NO: 11) et
20 5'-GCCAGCGGAAACCTCACACG-3' (SEQ ID NO:12) ;
taille du produit amplifié : 403 pb (KOBILKA
et al., Science, 1987, 238, 650-656) ;
- GLUT1 :
séquences oligonucléotidiques :
25 5'-TGCTGGCTGTGGGAGGA-3' (SEQ ID NO: 13) et
5'-GAGGATGCCGACGACGAT-3' (SEQ ID NO:14) ;
taille du produit amplifié : 470 pb (MUECKLER
et al., Science, 1985, 229, 941-945) ;
- GLUT4 :
séquences oligonucléotidiques :
30 5'-TCCTGCTGCCCTTCTGTC-3' (SEQ ID NO: 15) et
5'-GGCCTACCCCTGCTGTCT-3' (SEQ ID NO:16) ;
taille du produit amplifié : 309 pb (FUKUMOTO
& al., J. Biol. Chem., 1989, 264, 7776-7779) ;
- 35 - adipsine :

séquences oligonucléotidiques :

5'-CGGCTGGGGCATAGTCA-3' (SEQ ID NO: 17) et

5'-GCACGCCCCCGCACACC-3' (SEQ ID NO: 18) ;

taille du produit amplifié : 200 pb (WHITE et
5 al., J. Biol. Chem., 1992, 267, 9210-921) ;

- lipase (hormono-sensible) (HSL) :

séquences oligonucléotidiques :

5'-GGGGCTGAGTTTGAGCG-3' (SEQ ID NO: 19) et

5'-GCTCCTCACTGTCCTGTCC-3' (SEQ ID NO: 20) ;

10 taille du produit amplifié : 286 pb (LANGIN et
al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 4897-4901) ;

- lipase (lipoprotéine) :

séquences oligonucléotidiques :

5'-CCTGCTCGTGCTGACTCTG-3' (SEQ ID NO: 21) et

15 5'-GGGCTCCAAGGCTGTATC-3' (SEQ ID NO: 22) ;

taille du produit amplifié : 473 pb (WION KL.
et al., Science, 1987, 235, 1638-1641).

Les séquences nucléotidiques subséquentes ont
toutes été déterminées en employant le programme
20 d'analyse élémentaire Oligo 4.0 (National Biosciences,
Plymouth, MN 5547, USA).

En RT-PCR, les mêmes ARN messagers sont iden-
tifiés dans le clone et dans la lignée.

- Résultats :

25 La figure 1 illustre les produits exprimés par
les préadipocytes immortalisés conformes à l'invention
(lignée PAZ-6) : ces préadipocytes expriment les récep-
teurs adrénergiques $\beta 1$ (265 pb), $\beta 2$ (329 pb) et $\alpha 2$,
(403 pb), UCP (protéine découplante) (U et U' : 590 pb),
30 HSL (Hormone Sensitive Lipase) (H) (286 pb), adiposine
(Ad) (200 pb), GLUT1 (G1) (470 pb), GLUT4 (G4) (309 pb)
et β -actine (Ac) (336 pb). Chaque trace correspond à
200 ng d'ARN total initial, à partir duquel l'ADNc a été
amplifié comme suit : RT-PCR de 29 cycles (sauf U', PCR

de 39 cycles) effectuée avec (+) ou sans (-) reverse transcriptase.

M correspond à l'échelle de marqueur 123 pb.

La figure 2 montre la différenciation des pré-
5 adipocytes en culture après confluence dans un milieu ITT
supplémenté en T3, insuline et dexaméthasone, pendant 3
semaines.

La figure 3 montre les marqueurs exprimés par
les adipocytes et notamment les récepteurs $\beta 3$ ($\beta 3$, 316 pb)
10 et $\alpha 2$, adrénergiques et la LPL ; en outre les niveaux
d'expression d'adipsine, de HSL, LPL et GLUT4 sont plus
importants que ceux des préadipocytes.

En outre, ces cellules différenciées expriment
encore l'UCP (figure 3). L'ARNm de l'UCP est également
15 présent par hybridation Northern.

2 semaines après la conversion en adipocytes,
les cellules sont mises en culture dans un milieu
dépourvu d'insuline et de dexaméthasone, ce qui dans les
autres types cellulaires précédemment utilisés entraînait
20 une diminution de l'expression du récepteur adrénergique
 $\beta 3$, alors que ce n'est pas le cas pour ce qui concerne
les cellules PAZ-6 selon l'invention.

La RT-PCR est réalisée dans les mêmes condi-
tions que celles de la figure 1 (Ub=U'). 5 μ l sur 50 μ l
25 total ont été déposés sur gel. L'image du gel est en négatif.
Les mêmes fragments sont amplifiés.

Comme illustré ci-dessus, le RA- $\beta 3$ est exprimé
lorsque les préadipocytes bruns humains sont convertis en
adipocytes après traitement avec l'insuline, la
30 dexaméthasone et la pioglitazone.

Cette expression est également observée au
niveau ARNm à l'aide d'une amplification PCR modérée (29
cycles) et au niveau du récepteur à l'aide des essais de
liaison en présence d'antagonistes $\beta 1$ et $\beta 2$ (voir b.).

b. mise en évidence des récepteurs adrénergiques β (RA- β).

* détermination des sites de liaison au ligand antagoniste β l'iodocyanopindolol (I-CYP), dans la
5 lignée cellulaire PAZ-6.

- Méthode :

Les cellules sont lavées avec un tampon PBS, incubées pendant 5 minutes à 37°C avec une solution de trypsine/EDTA à 2 % et remises en suspension dans un
10 milieu DMEM supplémenté avec du sérum de cheval à 10 % (v/v).

Après centrifugation à 450 x g pendant 5 minutes à 4°C, le culot cellulaire est lavé 2 fois avec un tampon PBS, puis les cellules sont remises en
15 suspension dans du tampon PBS.

Pour les essais de liaison, 100 μ l de suspension cellulaire sont incubés (1) en présence de 500 pM d'I-CYP, et en présence ou en l'absence de bupranolol 50 μ M (pour définir les liaisons non-
20 spécifiques) ou (2) en présence de ICI 118551 et/ou de CGP 20712A (chacun à 0,1 mM).

L'essai de liaison proprement dit est effectué pendant 90 min à 25°C, dans un volume final de 250 μ l de PBS supplémenté avec 50 mg/ml de sérum albumine bovine et
25 de désipramine 1 mM.

La réaction est stoppée à l'aide d'une filtration rapide à travers un filtre en fibre de verre Whatman GF/C, préalablement immergé dans une solution de PBS contenant de la polyéthylèneimine à 0,3 %, pendant 30
30 min (pour réduire les liaisons non-spécifiques).

Les concentrations en protéine sont déterminées selon la méthode de M. Bradford (Anal. Biochem., 1976, 72, 248-256).

La sérum albumine bovine est utilisée comme
35 standard et les suspensions cellulaires sont

homogénéisées avec un homogénéiseur polytron pendant 5 secondes au maximum, avant la réaction.

- Résultats :

Dans la lignée non différenciée PAZ-6, environ
5 30 fmol de sites de liaison au I-CYP, dans les membranes isolées sont complètement bloqués par 50 μ M de bupranolol (la quantité de sites au I-CYP est donc d'environ 70 fmol), en présence de 500 pM de I-CYP et de 0,05 mM de bupranolol (qui bloque tous les sites de liaison β -
10 spécifiques : β 1-, β 2 et β 3 RA), comme illustré au Tableau I ci-après.

En présence de 100 nM d'ICI 118551 (antagoniste spécifique des $R\alpha\beta$ 2), les sites de liaison au I-CYP sont diminués de 46 %.

15 La présence de sites $RA-\beta$ 1 est vérifiée en utilisant du CGP 20712A, antagoniste spécifique des $RA-\beta$ 1, à une concentration de 10 nM. Dans ces conditions, 58 % des sites de liaison au I-CYP sont inhibés. Les deux antagonistes, utilisés simultanément, entraînent une
20 diminution (inhibition) du nombre de sites de liaison de 86 %.

Ceci indique que les sites de liaison au ICYP dans les cellules PAZ-6 non différenciées sont pour la plupart des sites β 1- et β 2-adrénergiques, en quantités
25 équimolaires.

Après différenciation de la lignée PAZ-6, on détermine la présence d'environ 20 fmol de sites de liaison au I-CYP, dans les mêmes conditions que celles exposées ci-dessus. En présence de l'antagoniste spécifique
30 des $RA-\beta$ 2, ICI 118551, le nombre de sites de liaison est réduit de 34 %. En présence de l'antagoniste spécifique des $RA-\beta$ 1, CGP 20712A, une diminution de 35 % est observée. Les deux antagonistes, utilisés simultanément, diminuent le nombre de sites de liaison de 64 %.

Ce résultat indique la présence de sites β_1 - et β_2 -adrénergiques en quantités équimolaires ainsi que la présence de sites β_3 , qui constituent au moins 36 % du nombre total de sites de liaison au I-CYP.

5

TABLEAU I

type cellulaire	Différenciation	Accumulation d'AMPC				
		pmol d'AMPC/mg prot			facteur de multiplication/taux basal	
		basal	ISO	CGP12177A	ISO	CGP12177A
PAZ-6	non	201±30	4344±1060	254±167	21±2	1,3±1
PAZ-6	oui	130±26	2083±1420	323±129	15±7	2,4±0,5

10 ISO = isoprénaline.

* accumulation d'AMPC dans la lignée cellulaire PAZ-6.

Dans la mesure où il n'existe pas d'antagoniste spécifique des RA- β_3 , une preuve directe de la présence de RA- β_3 ne peut pas être obtenue à partir de la détermination des sites de liaison au I-CYP. Toutefois, il existe un agoniste partiel, spécifique des RA- β_3 (CGP12177A), qui antagonise les RA- β_1 et β_2 ; en conséquence, une accumulation d'AMPC, après stimulation avec le CGP12177A, donnera une preuve directe de la présence de RA- β_3 .

- Méthode :

La méthode utilisée pour déterminer les taux intracellulaires d'AMPC est la suivante :

25 les cellules sont lavées une fois dans du PBS et incubées en l'absence ou en présence de 10 mM d'isoprénaline ou de CGP 12177A, pendant 15 min à 37°C, dans un tampon comprenant du PBS, de l'IBMX 0,5 mM et de l'acide ascorbique 0,5 mM.

30 Le tampon d'incubation est éliminé et les cellules sont lysées dans NaOH 1 M pendant au moins 20 min à 37°C. Le lysat est neutralisé avec de l'acide

acétique 1 M et centrifugé dans une microcentrifugeuse, à vitesse maximale, pendant 5 min.

Le surnageant est utilisé pour la détermination de l'AMPc (kit AMPc-³H Amersham).

5 - Résultats :

La stimulation des cellules PAZ-6 non-différenciées, par de l'isoprotérénol (10 μ M), active tous les récepteurs adrénergiques β , entraînant une augmentation des taux d'AMPc d'un facteur 21. CGP 12177A
10 (antagoniste β 1 et β 2 et agoniste partiel β 3) n'entraîne aucune stimulation significative de l'adénylyl cyclase, ce qui confirme l'absence de récepteurs adrénergiques β 3 fonctionnels dans ces cellules PAZ-6 non-différenciées.

La stimulation de la lignée cellulaire PAZ-6
15 différenciée avec de l'isoprotérénol (10 μ M) active tous les RA- β (augmentation du taux d'AMPc/taux basal, d'un facteur 15), tandis que la stimulation avec du CGP 12177A entraîne seulement une stimulation de 20 % (augmentation du taux d'AMPc d'un facteur 2,4), suggérant la présence
20 d'un nombre significatif de récepteurs adrénergiques β 3 couplés à l'adénylyl cyclase).

Cette stimulation partielle peut s'expliquer par la présence de RA- β 1 et - β 2, qui ne sont pas stimulés par le CGP 12177A et par les propriétés agonistes
25 partielles de ce composé. Ce résultat est compatible avec la conclusion ci-dessus qui précise que les sites de liaison au I-CYP, qui ne peuvent pas être bloqués par les antagonistes des RA- β 1 et - β 2 mais peuvent être bloqués par le bupranolol, représentent des sites de liaison aux
30 RA- β 3.

c. Essai de lipolyse (sur la lignée PAZ-6) :

- Méthode :

Le test de lipolyse consiste à mesurer la quantité de glycérol généré par les adipocytes matures
5 traités par des ligands lipolytiques.

Des monocouches d'adipocytes matures (différenciés) en plaques de culture (6 puits) sont lavées et préincubées une nuit dans du DMEM/Ham's F12 (1:1, v/v) comprenant 1 % de BSA sans acide gras. Les
10 cellules sont ensuite incubées dans un tampon Krebs-Ringer phosphate (pH 7,4) comprenant 2 % de BSA sans acide gras, 4,5 g/l de glucose, 50 µg/ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, et les ligands β -adrénergiques, dans un volume de 500 µl, pendant 2 heures à 37°C.

15 Le taux de glycérol est mesuré sur 100 µl de milieu d'incubation en suivant la réduction du NAD en NADH à 340 nm en présence de 10 µg/ml de glycérol déshydrogénase (issu d'*Enterobacter aerogenes*, Boehringer Mannheim) dans le tampon de réaction suivant : $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$,
20 125 mM pH 10, NAD 3,5 mM et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 330 mM.

- Résultats :

Les résultats sont reportés à la figure 4 qui illustre les résultats obtenus pour différents agonistes β : forskoline 10^{-4} M (colonne a), isoprotérénol 10^{-5} M
25 (colonne b), norépinéphrine 10^{-5} M (colonne c), mélange norépinéphrine 10^{-5} M + phentolamine à 20 µg/ml (colonne d),
épinéphrine 10^{-5} M (colonne e), mélange épinéphrine 10^{-5} M + phentolamine à 20 µg/ml (colonne f),
CGP 12177A 10^{-5} M (colonne g), CL 316,43 10^{-5} M (colonne h),
30 ICI 201651 10^{-5} M (colonne i), exprimés en nmol/puits/2 heures par rapport au taux basal.

Les résultats, illustrés à la figure 4, montrent une lipolyse induite par un agent stimulant directement l'adénylyl cyclase (forskoline), par des
35 agonistes des RA- β 1 et RA- β 2 (isoprotérénol,

norépinéphrine et épinéphrine), en présence ou non d'un antagoniste $\alpha 2$ adrénergique (phentolamine). On observe également une lipolyse induite par les agonistes spécifiques du RA- $\beta 3$ (antagoniste RA- $\beta 1$ et RA- $\beta 2$, comme le CGP 12777A, le CL 316,43 et l'ICI 20651). Ces observations suggèrent que la plupart de la lipolyse induite par l'isoprotérénol dans les adipocytes humains différenciés PAZ-6, est contrôlée par les récepteurs adrénergiques $\beta 3$.

10 d. Expression du gène Ob dans les cellules PAZ-6 différenciées.

Les cellules PAZ-6 différenciées expriment l'équivalent humain du produit du gène Ob murin.

Lorsqu'elle est injectée, la leptine (protéine Ob) diminue apparemment l'appétit et par voie de conséquence l'obésité chez les souris Ob, dans lesquelles le gène correspondant est muté. Chez l'Homme, aucune mutation du gène Ob n'a été observée et la concentration de la protéine Ob est significativement augmentée chez les sujets obèses.

L'apparition simultanée du RA- $\beta 3$ et du produit du gène Ob dans les adipocytes matures et différenciés PAZ-6, suggère l'existence d'un lien entre ces deux protéines.

25 En particulier, le traitement d'adipocytes de rat avec l'agoniste $\beta 3$ CL 316,43, semble réduire de manière importante les taux d'ARNm codant pour la protéine Ob.

Le fait que le gène Ob soit exprimé dans les adipocytes PAZ-6 est tout à fait surprenant. En effet, jusqu'à présent la protéine Ob a été essentiellement considérée comme jouant un rôle dans la régulation de la satiété. Sa mise en évidence dans les adipocytes bruns suggère qu'elle joue un rôle dans la thermogénèse.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

5

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- CNRS

(B) RUE: 3 rue Michel Ange

10

(C) VILLE: PARIS

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 75794 CEDEX 16

(A) NOM: STROSBERG Arthur Donny

15

(B) RUE: 66 rue de Javel

(C) VILLE: PARIS

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 75015

20

(A) NOM: ZILBERFARB Vladimir

(B) RUE: 14 rue Le Perdriel

(C) VILLE: VILLEBON SUR YVETTE

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 91140

25

(ii) TITRE DE L' INVENTION: LIGNEES IMMORTALISEES DE CELLULES
ISSUES DU TISSU ADIPEUX HUMAIN, LEUR PROCEDE DE PREPARATION
ET LEURS APPLICATIONS.

30

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 22

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

35

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

(A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 9504922

40

(B) DATE DE DEPOT: 25-APR-1995

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

45

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

27

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

10

TCGTGTGCAC CGTGTGGGCC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AGGAAACGGC GCTCGCAGCT GTCG

24

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 23 paires de bases

35 (B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

40

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GCCTGCTGAC CAAGAATAAG GCC

23

28

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 5 (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- 10 (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CCCATCCTGC TCCACCT

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

20

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 25 (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- 30 (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

35 ATGGCTCCGT GGCCTCAC

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 40 (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- 45 (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

5 CCCAACGGCC AGTGGCCAGT CAGCG

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

10 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

TAGGTATAAA GGTGTCCTGG

20

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 22 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

30 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

40

CACTTTTGTA CTGTCCTGGT GG

22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

30

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

10

GAGACCTTCA ACACCCC

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

15

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GTGGTGGTGA AGCTGTAG

18

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases

35

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

40

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CGAGCGAGCC AGGTGAAGCC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 5 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- 10 (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GCCAGCGGAA ACCTCACACG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

20

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
25 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

35 TGCTGGCTGT GGGAGGA

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 40 (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- 45 (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

5 GAGGATGCCG ACGACGAT 18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

10 (A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

TCCTGCTGCC CTTCTGTC 18

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

30 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

40 GGCCTACCCC TGCTGTCT 18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

10

CGGCTGGGGC ATAGTCA

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

15

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 17 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

GCACGCCCCC GCACACC

17

30

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 5 (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- 10 (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

GGGGCTGAGT TTGAGCG

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

20

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
25 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

35 GCTCCTCACT GTCCTGTCC

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 40 (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- 45 (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

5 CCTGCTCGTG CTGACTCTG 19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

10 (A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

GGGCTCCAAG GCTGTATC 18

MICRO-ORGANISMES	
Feuille descriptive relative au micro-organisme mentionné en page ... 4 ... ligne 30 de la description	
A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT	
D'autres dépôts sont déposés sur une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt	
Collection Nationale de Cultures de	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays)	
28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15	
Date du dépôt	N° d'ordre
7 février 1995	I-1531
B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
<p>"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (règle 28.4) de la CBE)".</p>	
C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
EUROPE CANADA ÉTATS-UNIS JAPON	
D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (à ne remplir que si nécessaire)	
Les indications énumérées ci-dessous seront soumises ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., le N° d'ordre du dépôt)	
E. <input type="checkbox"/> La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)	
(Fonctionnaire autorisé)	
<input type="checkbox"/> Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international	
(Fonctionnaire autorisé)	

REVENDICATIONS

1°) Lignées cellulaires, issues du tissu adipeux, caractérisées :

- en ce qu'elles sont constituées par des pré-adipocytes contenant un fragment d'acide nucléique comprenant au moins un fragment immortalisant d'un oncogène viral et au moins un promoteur sélectionné dans le groupe qui comprend le promoteur dudit oncogène viral et un fragment des régions régulatrices du gène humain de la vimentine,

- en ce qu'elles expriment au moins l'une des protéines suivantes : récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, protéine découplante (UCP), transporteurs de glucose, Glut1 et Glut4, lipoprotéine lipase (LPL) et

- en ce qu'elles sont aptes à être converties en adipocytes matures, qui produisent de la graisse, qui contiennent de nombreuses mitochondries, et expriment en outre les récepteurs $\alpha 2$, et $\beta 3$ adrénergiques ainsi que le produit d'expression du gène Ob et présentent un rapport Glut4/Glut1 inversé, par rapport auxdits préadipocytes immortalisés.

2°) Lignées cellulaires selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont issues du tissu adipeux brun.

3°) Lignées cellulaires selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisées en ce que le fragment immortalisant est constitué par un fragment de l'oncogène T SV40, codant pour l'antigène T du virus SV40.

4°) Lignées cellulaires selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que le promoteur est sélectionné parmi le promoteur de l'oncogène T SV40 et le promoteur de la vimentine et plus particulièrement le fragment d'acide nucléique du promoteur de la vimentine compris entre les bases -878 et +93 de la séquence régulatrice de la vimentine.

5°) Lignées cellulaires selon la revendication 4, caractérisées en ce que le fragment d'acide nucléique du promoteur de la vimentine comprend les bases -830 à -539 et/ou le fragment -540 à -140, situés en amont du site CAP.

6°) Lignées cellulaires selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisées en ce qu'elles ont été déposées auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) tenue par l'INSTITUT PASTEUR, en date du 7 février 1995 sous le n° I-1531.

7°) Lignées cellulaires selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, issues du tissu adipeux brun, caractérisées :

- en ce qu'elles expriment au moins les protéines suivantes : récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, protéine découplante, Glut1 et Glut4, lipoprotéine lipase ;

- en ce qu'elles sont aptes à être converties en adipocytes matures :

. qui produisent de la graisse multilobaire,
. qui contiennent de nombreuses mitochondries,
. qui expriment les récepteurs $\alpha 2$, et $\beta 3$ adrénergiques ainsi que le produit d'expression du gène Ob, et

. qui présentent un rapport Glut4/Glut1 inversé, par rapport aux dits préadipocytes immortalisés.

8°) Séquences d'acide nucléique, issues des lignées selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles sont aptes à exprimer au moins l'une des protéines suivantes : récepteurs $\beta 1$ -, $\beta 2$ - ou $\beta 3$ -adrénergiques, protéine découplante, Glut1 et Glut4, lipoprotéine lipase (LPL).

9°) Procédé d'obtention de préadipocytes immortalisés, issus de tissus adipeux (bruns ou blancs) humains, caractérisé en ce qu'il comprend la transformation de préadipocytes issus du tissu adipeux (brun ou

blanc) humain par une séquence d'acide nucléique telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10°) Procédé de conversion des préadipocytes selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 en adipocytes matures, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture des préadipocytes immortalisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

11°) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit milieu comprend en outre au moins l'un des composés suivants : glucocorticoïde, triiodothyronine (T3), éventuellement associée à de la pioglitazone ou à ses dérivés, agonistes des récepteurs β -adrénergiques, NPY, mélatonine.

12°) Procédé de sélection et d'identification de substances capables de réguler la lipolyse et/ou la thermogenèse, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact des préadipocytes immortalisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, avec au moins une substance apte à les transformer en adipocytes,

- la mise en contact des adipocytes matures obtenus avec une substance agissant sur au moins un récepteur tels que les récepteurs α_2 ou β_3 adrénergiques, les récepteurs de l'insuline, de l'IGF, les récepteurs de l'ACTH et les récepteurs du métabolisme du glucose (Glut1, Glut4) desdits adipocytes matures, en vue de la modulation de la lipolyse et/ou de la thermogenèse et

- la détection de la formation d'un complexe du type ligand-récepteur.

13°) Modèle d'étude des protéines exprimées par les adipocytes, caractérisé en ce qu'il est constitué par des préadipocytes immortalisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou des adipocytes matures obtenus à partir desdits préadipocytes immortalisés.

14°) Compositions lipolytiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent des adipocytes matures obtenus

à partir des préadipocytes immortalisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

15 15°) Anticorps anti-adipocytes, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par immunisation d'un animal approprié avec des adipocytes matures obtenus conformément au procédé de conversion des préadipocytes immortalisés en adipocytes matures selon la revendication 10 ou la revendication 11.

10 16°) Utilisation des anticorps anti-adipocytes selon la revendication 15 pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de l'obésité.

15 17°) Modèle d'étude de la régulation des gènes présents dans les adipocytes humains, caractérisé en ce qu'il est constitué par des préadipocytes immortalisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou des adipocytes matures obtenus à partir desdits préadipocytes immortalisés.

20 18°) Compositions pharmaceutiques destinées à combattre l'obésité, caractérisées en ce qu'elles comprennent des adipocytes bruns matures, obtenus à partir des préadipocytes immortalisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, éventuellement associées à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25 19°) Procédé pour l'étude de l'affinité d'un récepteur exprimé par des adipocytes, pour un ou plusieurs ligands déterminés, lequel procédé comprend :

30 - la mise en contact des préadipocytes immortalisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, avec au moins une substance apte à les transformer en adipocytes,

- la mise en contact des adipocytes matures obtenus avec les ligands déterminés, et

- la détection d'une réaction affine entre lesdits adipocytes et lesdits ligands déterminés.

35 20°) Kit ou trousse de détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour une protéine exprimée par un adipocyte, caractérisé en ce qu'il comprend :

41

- une culture de préadipocytes selon l'une quelconque des revendications 1 à 7,

- des moyens de conversion desdits préadipocytes en adipocytes matures, et

5 un ou plusieurs ligands témoins.

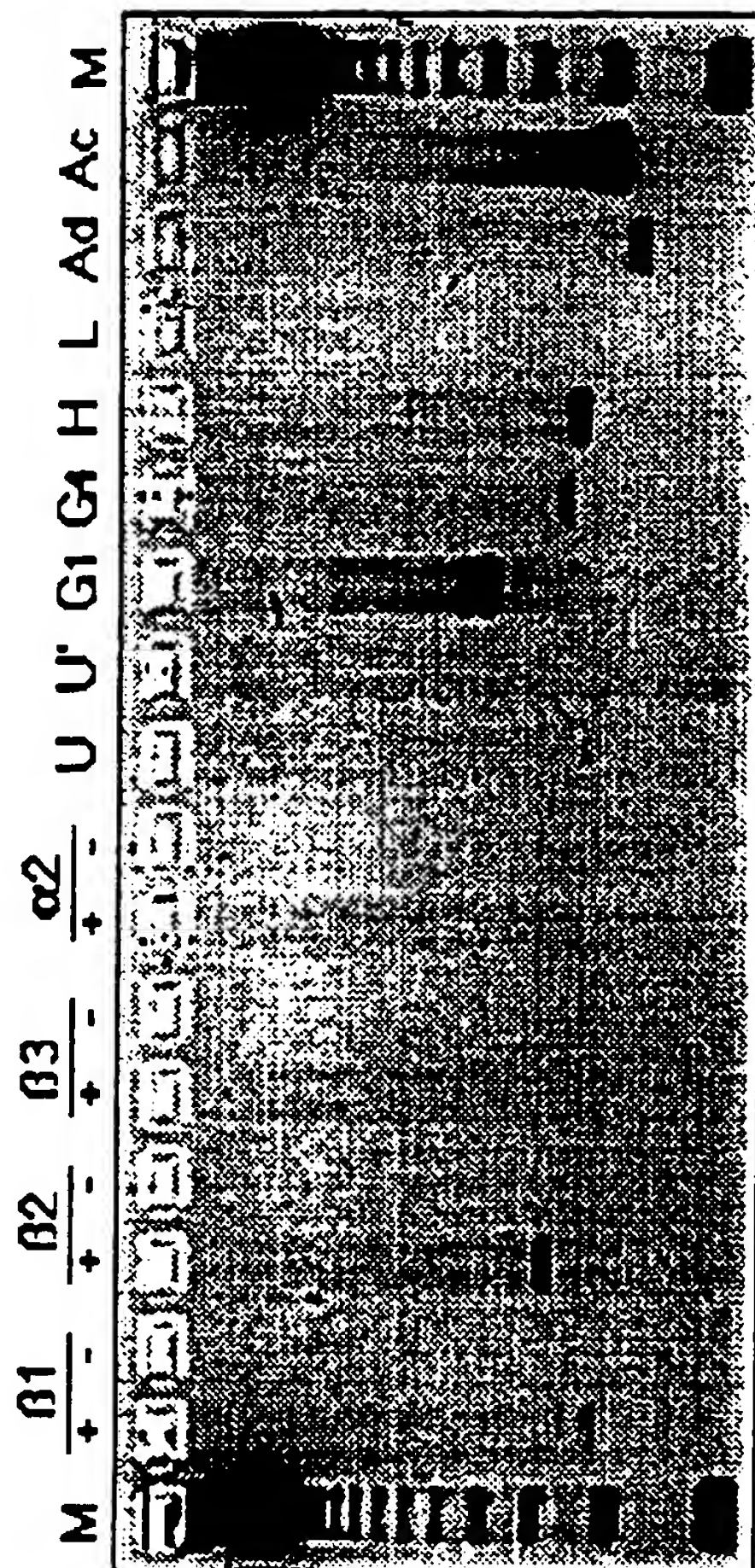


FIGURE 1

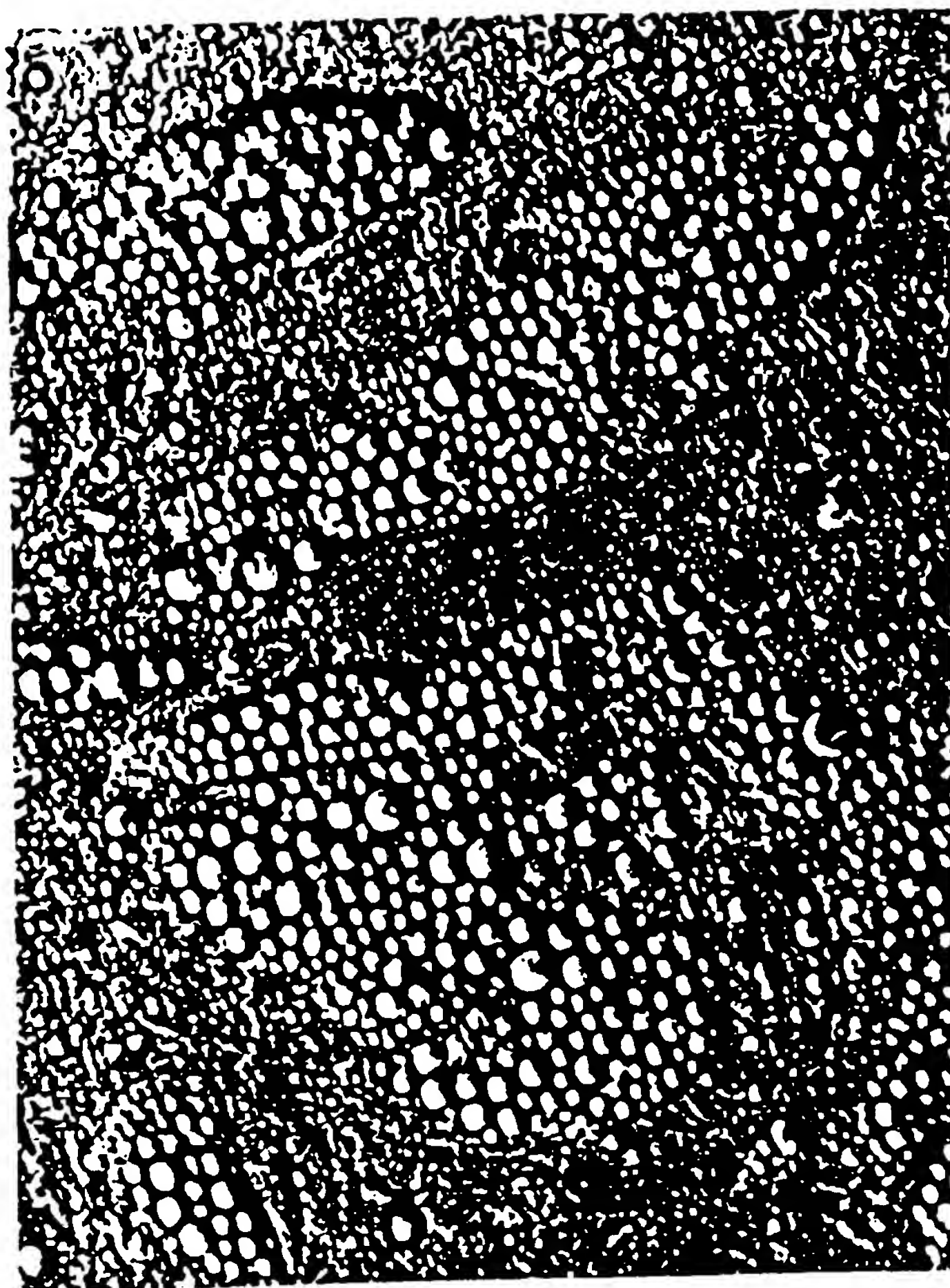


FIGURE 2

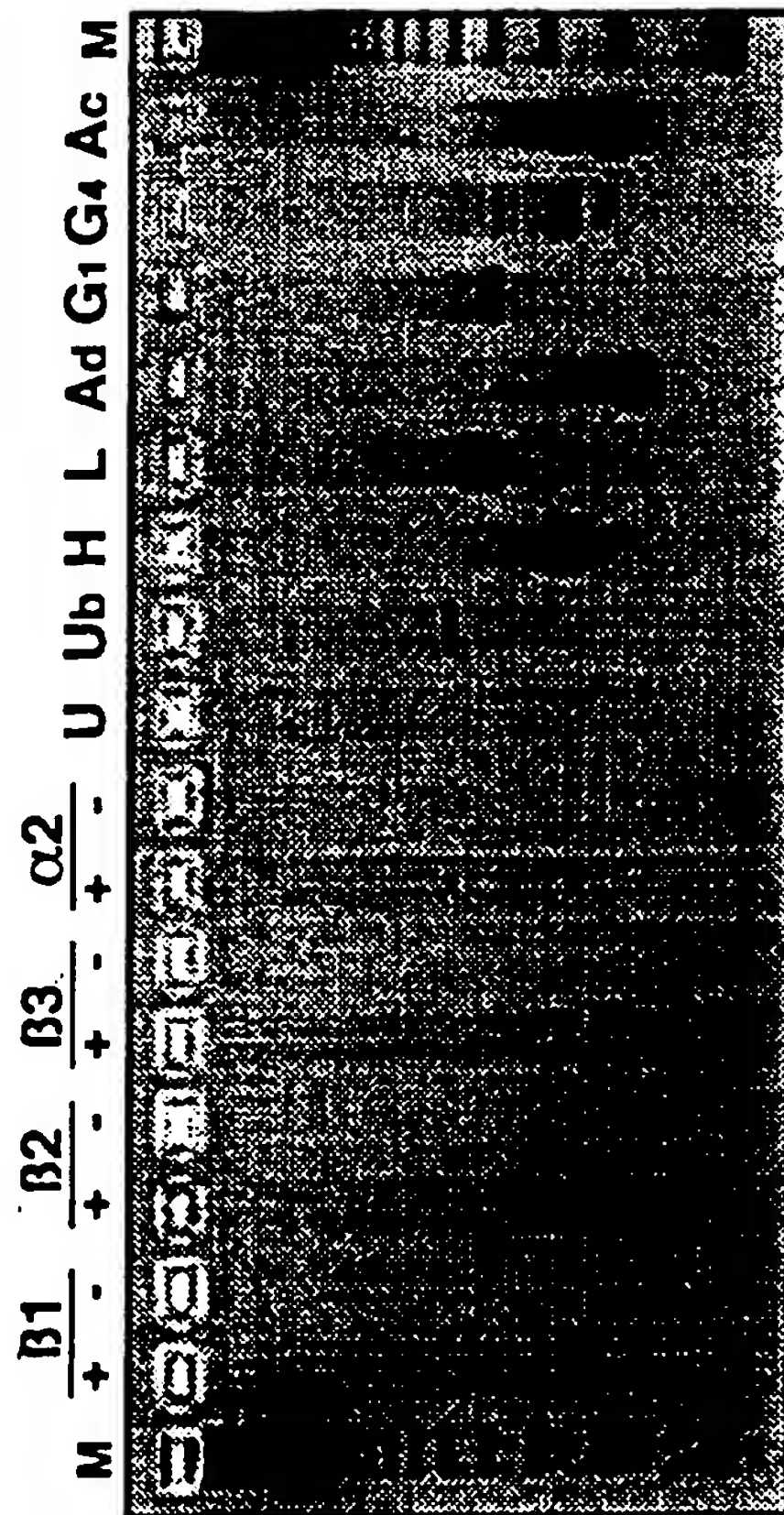
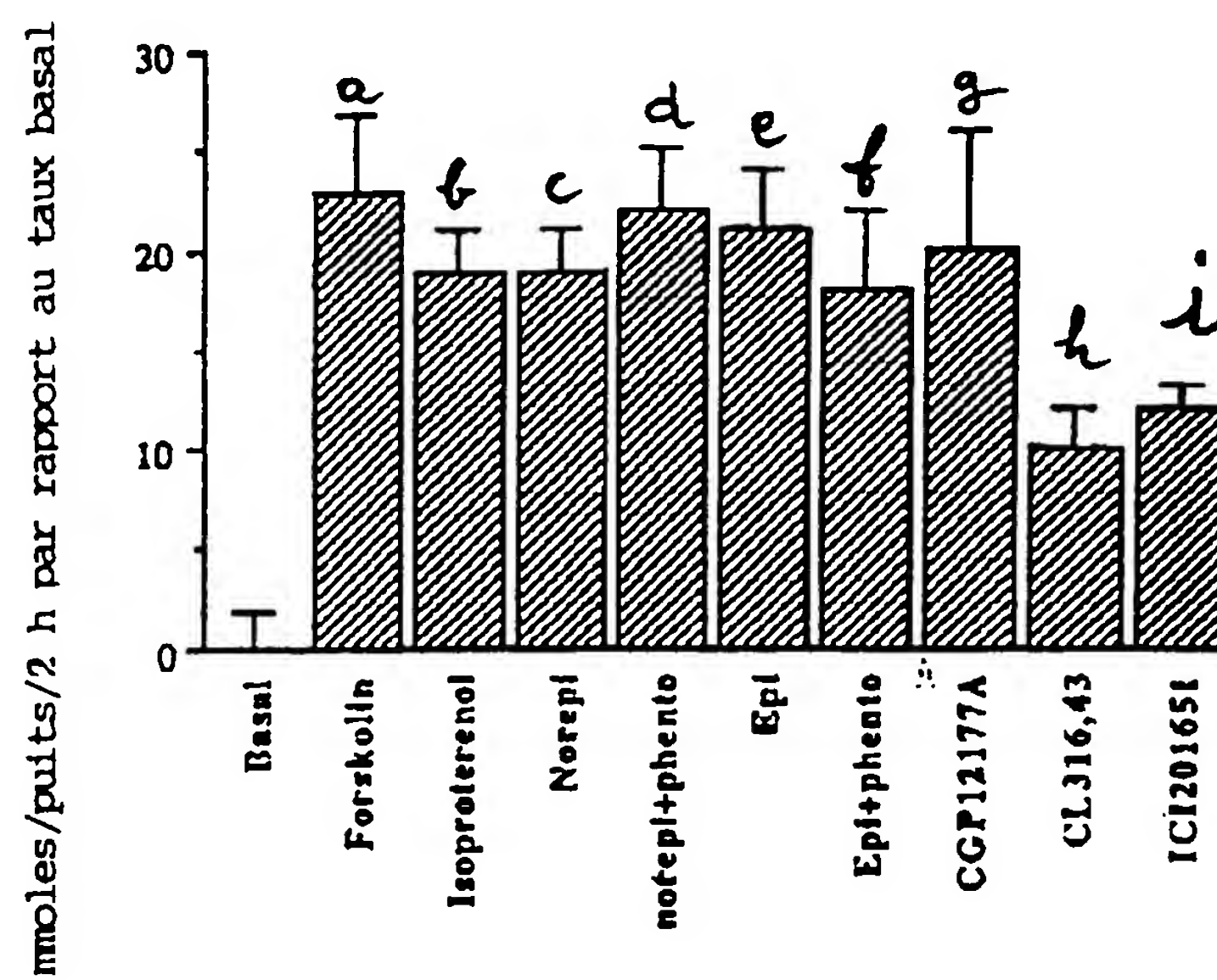


FIGURE 3

4 / 4

FIGURE 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/FR 96/00634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 C12N15/55 C12N5/10 C07K16/18 G01N33/50
A61K35/12 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOL.CELL.BIOL, vol. 4, no. 4, pages 712-721, XP002013115 YASUMOTO: "HORMONAL REGULATION OF THE TRANSFORMATION PHENOTYPE IN SIMIAN VIRUS 40-TRANSFORMED RAT EMBRYONIC PREADIPOSE CELL LINES" see the whole document ---	1-20
A	FEBS LETTERS, vol. 215, no. 2, pages 345-349, XP002013116 TOBE ET AL: "DIFFERENTIAL EFFECTS OF DNA TUMOR VIRUS NUCLEAR ONCOGENE PRODUCTS ON ADIPOCYTE DIFFERENTIATION" see the whole document --- -/--	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 1996

Date of mailing of the international search report

20.09.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1, FR 96/00634

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 409 696 (UNIV PARIS VII) 23 January 1991 cited in the application ---	
A	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, vol. 90, pages 9611-9615, XP002013117 NINOMIYA-TSUJI ET AL: "TUMOR NECROSIS FACTOR-INDUCED C-MYC EXPRESSION IN THE ABSENCE OF MITOGENESIS IS ASSOCIATED WITH INHIBITION OF ADIPOCYTE DIFFERENTIATION" ---	
A	J.BIOL.CHEM., vol. 265, no. 27, 25 September 1990, pages 16343-16349, XP002013118 FÈVE ET AL: "DIFFERENTIAL REGULATION OF BETA1- AND BETA2-ADRENERGIC RECEPTOR PROTEIN AND MRNA LEVELS BY GLUCOCORTICOIDS DURING 3T3-F442A ADIPOSE DIFFERENTIATION" ---	
A	J.BIOL.CHEM., vol. 266, no. 30, 25 October 1991, pages 20329-20336, XP002013119 FÈVE ET AL: "ATYPICAL BETA-ADRENERGIC RECEPTOR IN 3T3-F442A ADIPOCYTES.PHARMACOLOGICAL AND MOLECULAR RELATIONSHIP WITH THE HUMAN BETA3-ADRENERGIC RECEPTOR" ---	
A	J.BIOL.CHEM., vol. 269, no. 9, 4 March 1994, pages 6664-6670, XP002013120 KRIEF ET AL: "TRANSCRIPTIONAL MODULATION BY N-BUTYRIC ACID OF BETA1-,BETA2-, AND BETA3-ADRENERGIC RECEPTOR BALANCE IN 3T3-F442A ADIPOCYTES" ---	
A	DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABRÉGÉ 94130843, KOZAK ET AL: "NOREPINEPHRINE-DEPENDENT SELECTION OF BROWN ADIPOCYTE CELL LINES" XP002013121 & ENDOCRINOLOGY, (1994 FEB) 134 (2) 906-13 see abstract -----	

ormation on patent family members

PCi, FR 96/00634

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 96/00634

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/12 C12N15/55 C12N5/10 C07K16/18 G01N33/50 A61K35/12 A61K39/395		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MOL.CELL.BIOL, vol. 4, no. 4, pages 712-721, XP002013115 YASUMOTO: "HORMONAL REGULATION OF THE TRANSFORMATION PHENOTYPE IN SIMIAN VIRUS 40-TRANSFORMED RAT EMBRYONIC PREADIPOSE CELL LINES" voir le document en entier ---	1-20
A	FEBS LETTERS, vol. 215, no. 2, pages 345-349, XP002013116 TOBE ET AL: "DIFFERENTIAL EFFECTS OF DNA TUMOR VIRUS NUCLEAR ONCOGENE PRODUCTS ON ADIPOCYTE DIFFERENTIATION" voir le document en entier ---	1-20
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 11 Septembre 1996		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 20.09.96
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 96/00634

C.(rule) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 409 696 (UNIV PARIS VII) 23 Janvier 1991 cité dans la demande ---	
A	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, vol. 90, pages 9611-9615, XP002013117 NINOMIYA-TSUJI ET AL: "TUMOR NECROSIS FACTOR-INDUCED C-MYC EXPRESSION IN THE ABSENCE OF MITOGENESIS IS ASSOCIATED WITH INHIBITION OF ADIPOCYTE DIFFERENTIATION" ---	
A	J.BIOL.CHEM., vol. 265, no. 27, 25 Septembre 1990, pages 16343-16349, XP002013118 FÈVE ET AL: "DIFFERENTIAL REGULATION OF BETA1- AND BETA2-ADRENERGIC RECEPTOR PROTEIN AND MRNA LEVELS BY GLUCOCORTICOIDS DURING 3T3-F442A ADIPOSE DIFFERENTIATION" ---	
A	J.BIOL.CHEM., vol. 266, no. 30, 25 Octobre 1991, pages 20329-20336, XP002013119 FÈVE ET AL: "ATYPICAL BETA-ADRENERGIC RECEPTOR IN 3T3-F442A ADIPOCYTES.PHARMACOLOGICAL AND MOLECULAR RELATIONSHIP WITH THE HUMAN BETA3-ADRENERGIC RECEPTOR" ---	
A	J.BIOL.CHEM., vol. 269, no. 9, 4 Mars 1994, pages 6664-6670, XP002013120 KRIEF ET AL: "TRANSCRIPTIONAL MODULATION BY N-BUTYRIC ACID OF BETA1-,BETA2-, AND BETA3-ADRENERGIC RECEPTOR BALANCE IN 3T3-F442A ADIPOCYTES" ---	
A	DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABRÉGÉ 94130843, KOZAK ET AL: "NOREPINEPHRINE-DEPENDENT SELECTION OF BROWN ADIPOCYTE CELL LINES" XP002013121 & ENDOCRINOLOGY, (1994 FEB) 134 (2) 906-13 voir abrégé -----	

Renseignements relatifs aux nbres de familles de brevets

Dem. Internationale No .

PCT/FR 96/00634

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0409696	23-01-91	FR-A- 2649721	18-01-91

